

УДК 541.183.022: 541.64

МОНОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СЛОИ КОЛЛАГЕНА

А. С. Фадеев, С. М. Левачев, В. Н. Измайлова

(кафедра коллоидной химии)

Изучены мономолекулярные слои коллагена, выделенного из склеры глаза свиньи, на границе вода – воздух при pH от 3.0 до 12.0. Показано, что изотермы двумерного давления коллагена характеризуются областями жидкорастянутого и жидкоконденсированного состояния с ярко выраженным плато, отражающим формирование фибрилл из отдельных молекул коллагена в горизонтальной ориентации. Наибольшее двумерное давление коллапса (60 мН/м) наблюдается в изоэлектрическом состоянии коллагена и уменьшается при переходе в кислую и щелочную области вследствие электростатического отталкивания между макромолекулами. Обнаружен гистерезис изотерм двумерного давления как в жидкорастянутом, так и в жидкоконденсированном состоянии, что связано с фибриллообразованием коллагена. Рассчитаны модули эластичности монослоев коллагена при разных pH. Наибольшее значение модуля эластичности ($\epsilon_0 = 67$ мН/м) обнаружили монослои при изоэлектрическом состоянии коллагена. Сделан вывод, что на поверхности воды формируются самоорганизующиеся двумерные структуры, образованные молекулами и фибриллами коллагена.

Изучение мономолекулярных слоев белков на границе вода–воздух представляет интерес в связи с моделированием биологических мембран. Подавляющее большинство работ в этой области посвящено исследованиям глобулярных белков [1]. Белкам других типов, например фибриллярным, уделялось значительно меньше внимания.

Белки образуют устойчивые монослои, обратимо сжимаемые до определенного двумерного давления, величина которого зависит от свойств белка. Изотермы (двумерное давление π – площадь A) схожи для большинства белков. До сих пор не разработана приемлемая модель строения белкового монослоя. Обычно из экспериментальных данных путем экстраполяции изотермы на нулевое давление в ее восходящей части определяют характеристическую площадь на молекулу (S_0). Эту величину можно сравнить с размерами молекулы белка и сделать некоторые выводы о степени конденсированности монослоя [2]. Несовпадение данных обычно связывают с процессами десорбции белка из монослоя в объемную фазу, изменением конформации или ассоциации и др.

Коллаген – фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани животных и обеспечивающий ее прочность [3]. Коллаген присутствует во всех тканях глаза человека и животных [4]. Это наиболее распространенный животный белок, составляющий у млекопитающих около 30% от всей массы белков. Молекула коллагена состоит из трех α -цепей (каждая содержит более 1000 аминокислотных остатков), скрученных в одну регулярную спираль, стабилизированную водородными связями между боковыми группами составляющих ее аминокислот. Молекула представляет собой жесткий стержень длиной 300 нм и диаметром 1.5 нм. Различают несколько типов

коллагена, отличающихся аминокислотным составом α -цепей [3].

Свойства монослоев коллагена на поверхности водных растворов описаны лишь в немногих работах [5–9], значительно лучше изучена желатина [1]. В ранних работах [5–8], когда свойства коллагена были еще недостаточно изучены, исследователи нередко называли коллагеном продукт его денатурации – желатину. Из известных нам работ только одна [9] посвящена изучению свойств нативного коллагена. Показано, что монослои коллагена и желатины наименее расширены на подложках, pH которых близки к изоэлектрической точке (ИЭТ) белков (~5.8 для коллагена и ~4.8 для желатины); при этом смещение pH в щелочную область оказывает на монослои коллагена расширяющее действие, значительно более сильное, чем на монослои желатины. Исследовано влияние трехвалентных ионов металлов (Fe^{3+} , Al^{3+} , Cr^{3+}) на поведение белков в монослоях. Установлено, что введение в водную подложку ионов Fe^{3+} оказывает на монослои коллагена и желатины чрезвычайно сильное конденсирующее и стабилизирующее действие. Так, на подложке с pH 3.0, содержащей 10^{-3} М ионов Fe^{3+} , поверхностное давление в монослое коллагена, сжатом до ~ 0.5 м²/мг, достигает ~ 60 мН/м. Причина этого эффекта, по мнению авторов, в образовании на поверхности раздела вода/воздух двумерных комплексов макромолекул с ионами Fe^{3+} по механизму координации связи ионов металла =NH- и =CO- группами молекул белка. В это же время ионы Cr^{3+} оказывают на монослои белков существенно меньшее действие, а ионы Al^{3+} эффективны только в случае желатины.

Данная работа проведена с фибриллярным белком коллагеном, поверхностные свойства которого мало изу-

чены. Целью работы было исследование мономолекулярных слоев коллагена на водной подложке при различных рН и изучение гистерезиса изотерм сжатия–растяжения (π – A).

Материалы и методы

Источником коллагена для исследований служила склера глаза свиньи в связи с относительно большим содержанием коллагена и легкостью его извлечения [10–11]. В склере в наибольшем количестве содержится коллаген типа I [11–12], присутствуют также типы III (уменьшается с возрастом) и V. Склера содержит значительные количества полисахаридов и протеогликанов [13–15], которые легко удаляются при обработке щелочью. Предварительное замораживание–размораживание ткани склеры нарушает пространственное расположение коллагеновых фибрилл и связанных с ними гликозаминогликанов [16–17], что облегчает щелочную экстракцию последних и уменьшает время ее проведения. После нейтрализации щелочи практически чистый коллаген растворяют в 0.05–0.30 М CH_3COOH . Молекулярная масса определена методом SDS-PAGE и составляет 285 кДа.

При выделении коллагена и приготовлении растворов были использованы следующие реактивы марки «Реахим»: NaOH «ч.д.а.», Na_2SO_4 «ч.д.а.», H_3BO_3 «х.ч.», BaCl_2 «ч.д.а.», CH_3COOH «х.ч.», HCl «х.ч.», бидистиллированная H_2O .

Для формирования и исследования монослоев в работе использовались весы Ленгмюра кругового типа. Прибор позволяет регистрировать изменение поверхностного натяжения в процессе изменения площади пленки поверхностно-активного вещества, нанесенного на поверхность раздела жидкость – воздух.

Прибор состоит из трех блоков: непосредственно измерительной ячейки, блока индикации и блока управления. Измерительная ячейка (рис. 1) представлена круглой ванной (a) из фторопласта. Внутри ванны имеются две перегородки, образующие вспомогательный отсек (b), предназначенный для приема избытка жидкости, сбрасываемой в него при движении барьера (c). Барьер также выполнен из фторопласта. Он вставляется в специальный

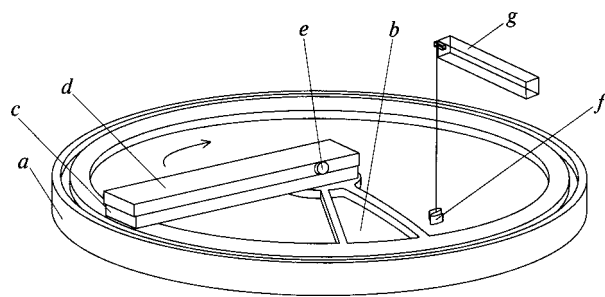


Рис. 1. Общий вид ванны Ленгмюра кругового типа (пояснения в тексте)

держатель (d) с центральной осью, проходящей через штифт, и закрепляется винтом (e). Центральная ось вращается электроприводом (при этом барьер совершает вращательное движение по поверхности ванны), она соединена с резистором, служащим для измерения и преобразования площади пленки в электрический сигнал.

Двумерное давление измеряли с помощью пластинки Вильгельми. Была использована рифленая пластинка (f) из вольфрама с периметром 10 см, подвешенная на держателе механотрона (g), преобразующего механическое усилие в электрический сигнал. Измерительную пластинку и механотрон одновременно перемещали в вертикальном направлении с помощью подъемного механизма, микрометрический винт которого вынесен на переднюю панель прибора.

Блок регистрации представляет собой двухкоординатный самописец: на оси X регистрируется изменение площади пленки, на оси Y – двумерное давление π , равное разности между поверхностным натяжением подложки σ_0 и поверхностным натяжением с нанесенным веществом σ_T ($\pi = \sigma_0 - \sigma_T$). Калибрование показаний самописца производится путем подвешивания на держателе механотрона груза известной массы (500 мг) и записи показаний самописца (подвешенный груз соответствует давлению 50 мН/м).

Блок управления служит для проведения экспериментов по определению изотерм двумерного давления. Согласно схеме прибора движение самописца по оси X начинается с того момента, когда барьер пройдет определенный путь. При этом площадь поверхности ванны составляет $3.27 \cdot 10^{-2} \text{ м}^2$. Конечная точка движения соответствует площади монослоя $1.4 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2$. Изменение площади поверхности составляет $3.13 \cdot 10^{-2} \text{ м}^2$. Чувствительность прибора при комнатной температуре составляет 0.10–0.01 мН/м в зависимости от настройки.

Экспериментальная часть

Энуклеированные замороженные глазные яблоки свиньи (-20°) размораживали при комнатной температуре, склера была отделена от остатков мышц, связок и пигмента и промыта холодной водой. Полученная ткань может храниться в замороженном виде в течение 3–4 недель.

Выделение коллагена. 100 г очищенной склеры заливали 5 л щелочного раствора (66 г NaOH + 100 г Na_2SO_4 на 1 л раствора) и при периодическом перемешивании выдерживали при 20° в течение 36 ч. При этом полисахариды и протеогликаны, составляющие значительную часть склеры, переходили в раствор. Затем склеру отделяли от раствора на воронке Бюхнера и промывали 10 л дистиллированной воды. Для нейтрализации щелочи ткань была обработана 2%-м H_3BO_3 в течение 40 мин при перемешивании на магнитной мешалке. Обработку склеры раствором борной кислоты повторяли 4 раза до установления рН раствора 6.0. После нейтрализации щелочи склеру

4 раза отмывали от H_3BO_3 и Na_2SO_4 дистиллированной водой (5 л), каждый раз в течение 40 мин при 20° при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Степень отмывки определяли по полному удалению SO_4^{2-} (реакция с $BaCl_2$).

Получение раствора коллагена. К отмытой склере добавляли равное по объему количество 0.3 М CH_3COOH и выдерживали полученную гелеобразную полупрозрачную массу в течение 7–8 сут при 4° и слабом перемешивании. В этих условиях коллаген переходит в раствор, и склера растворяется практически без остатка. Полученный раствор гомогенизируют и фильтруют через стеклянный фильтр с размером пор 160 мкм, используя водоструйный насос. Концентрация коллагена в полученном растворе (по сухому остатку) составляет 2% по массе. Часть полученного раствора разбавляли 0.2 М Na-ацетатным буфером с pH 3.44 до концентрации $8.6 \cdot 10^{-6}$ и $8.6 \cdot 10^{-7}$ М.

Определение концентрации. Содержание коллагена в пробах определяли модифицированным методом Лоури [18] при помощи реактива Фолина–Чиокалто. В качестве стандарта использовали раствор желатины известной концентрации. Регистрацию проводили спектрофотометрически при $\lambda = 750$ нм. Реакционная смесь состояла из 0.04 М $CuSO_4$, 0.11 М $Na_2C_4H_4O_6$, 0.05 М Na_2CO_3 , 0.4 М NaOH, реактива Фолина–Чиокалто и коллагенового раствора. Метод основан на регистрации окрашенного соединения, образующегося при взаимодействии белка с реактивом Фолина [19].

Формирование монослоев. Для получения монослоев водный раствор коллагена наносили мерной пипеткой (деление шкалы 1 мкл, полный объем 200 мкл) по 20 мкл на каждый опыт, осторожно помещая капли раствора на

водную подложку в место, равноудаленное от барьера, краев ванны и пластинки Вильгельми. В качестве подложки использовали водный раствор, приготовленный на основе дистиллированной воды и соответствующих небольших добавок HCl или NaOH для получения задаваемых значений pH. Барьер уменьшал площадь монослоя со скоростью $1.59 \cdot 10^{-4}$ см²/с, опыты проводили при температуре 20° . Получены изотермы сжатия–растяжения (π –A) для нанесенного коллагена при pH 3.0–12.0 и изменении площади от 0.15 мг/м² (3158 нм² на молекулу) до 35.1 мг/м² (13.5 нм² на молекулу).

Результаты и обсуждение

Рассмотрим влияние pH водного раствора подложки на изотермы двумерного давления коллагена. Результаты представлены на рис. 2, 3 и в табл. 1. Видно (рис. 2), что кривые имеют вид, типичный для жидких пленок с переходом от жидкорастянутого к жидкоконденсированному состоянию. Собственная площадь молекулы в «лежачем» положении по расчетам, исходя из геометрических параметров молекул, составляет 450 нм², в вертикальном («стоячем») положении – 2.25 нм². Для анализа изотерм выберем следующие характерные области: площадь на молекулу A (нм²) начала подъема кривой; интервал площадей на молекулу A (нм²), когда наблюдается плато на кривых π –A и значения двумерного давления в области плато; площадь, приходящаяся на молекулу в конце подъема кривых π –A, т.е. начало коллапса и соответствующее двумерное давление коллапса. Сравним выбранные области π –A с рассчитанными размерами коллагена в «лежачем» и «стоячем» положениях.

Начало подъема на кривых π –A коллагена на водной подложке для всех значений pH при площадях на молеку-

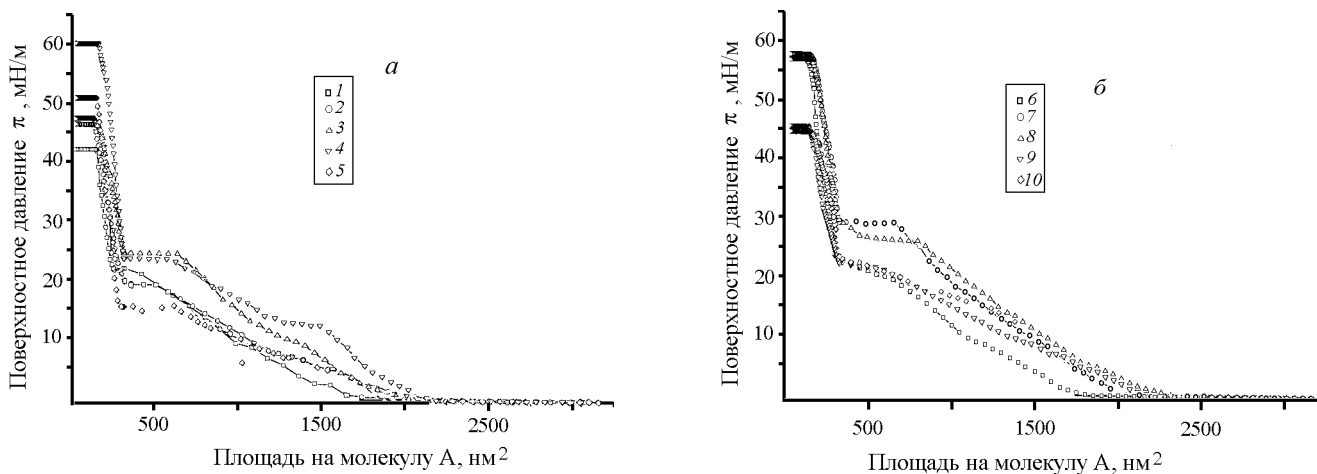


Рис. 2. Изотермы двумерного давления (π – A) сжатия монослоев коллагена, полученные на водных подложках при различных значениях pH: 1 – 3.0, 2 – 4.0, 3 – 5.0, 4 – 6.0, 5 – 7.0, 6 – 8.0, 7 – 9.0, 8 – 10.5, 9 – 11.0, 10 – 12.0. Концентрации наносимого коллагенового раствора $C = 8.6 \cdot 10^{-6}$ и $8.6 \cdot 10^{-7}$ М

Таблица 1

Параметры изотерм двумерного давления сжатия монослоев коллагена в зависимости от рН подложки. Концентрации наносимого коллагена составляли $8.6 \cdot 10^{-6}$ и $8.6 \cdot 10^{-7}$ М

рН	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.5	11.0	12.0
Начало подъема A , нм^2	2000	2000	2000	2150	1800	1800	2000	2300	2300	2350
Площадь на молекулу в области постоянных π (плато) A , нм^2	300–250	500–350	630–410	570–310	600–300	320–290	650–310	760–400	500–410	400
Двумерное давление, соответствующее плато π , мН/м	22.0	19.3	24.5	23.6	15.4	21.8	27.3	27.7	20.2	20.9
Площадь на молекулу, соответствующая началу коллапса (конец подъема) A , нм^2	131	127	130	143	138	139	130	142	138	137
Давление коллапса π , мН/м	42.2	46.4	47.3	60.3	50.9	53.6	54.1	53.2	42.7	41.8

Таблица 2

Зависимость модуля эластичности $\epsilon_0 = d\pi/d \ln A$ (мН/м) и $d\pi/d\Gamma$ в монослоях коллагена в областях жидкорастянутого и жидкоконденсированного состояния от рН водной подложки

Монослои коллагена	рН подложки	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.5	11.0	12.0
Жидкорастянутое состояние (до плато)	ϵ_0 , мН/м	13.2	12.5	20.7	20.3	12.2	19.3	24.1	24.7	24.2	19.4
	$d\pi/d\Gamma$	19.8	29.1	46.5	44.8	25.4	43.2	56.3	60.5	56.9	48.5
Жидкоконденсированное состояние (после плато)	ϵ_0 , мН/м	36.3	31.3	29.9	66.7	21.5	18.7	35.2	39.1	34.7	44.2
	$d\pi/d\Gamma$	14.7	17.9	18.6	34.8	10.0	8.4	15.8	19.0	14.3	19.1

лу, равных 1800–2300 нм^2 . Эти значения в несколько раз больше рассчитанных площадей на молекулу в горизонтальном «лежачем» положении (450 нм^2) и мало зависят от рН подложки. При площадях, приходящихся на молекулу коллагена, в 700–300 нм^2 (сравнимых с площадью на молекулу коллагена в «лежачем» положении) на кривых π - A обнаруживается плато. Это означает, что повышение поверхностной концентрации коллагена на водных подложках приводит к уменьшению площади на молекулу коллагена при неизменном двумерном давлении π , зависящем только от рН, т.е. от заряда на макромолекулах коллагена. Сжатие монослоев коллагена до 120–130 нм^2 приводит к появлению плато с постоянным двумерным давлением, равным 40–60 мН/м . Такие значения площадей, приходящихся на молекулу, в 4 раза меньше соответствующих площадей коллагена в «лежачем» положении и в 50 раз больше, чем в «стоячем». Можно предположить, что происходит ассоциация молекул коллагена и образование более упорядоченных поверхностных структур. Дальнейшее сжатие монослоя коллагена приводит к еще меньшей площади на молекулу, соответствующей формированию фибрилл коллагена, двумерное давление при этом не изменяется. Наблюдается зависимость давления коллапса коллагена от рН подложки (рис. 3). Наибольшее

значение давления коллапса в изоэлектрическом состоянии наблюдается при рН 6.0 и составляет 60 мН/м . При переходе в кислую и щелочную области давление коллапса уменьшается.

Анализируя ход кривых изотерм двумерного давления коллагена (рис. 2), можно заключить, что имеющиеся перегибы кривых обусловлены ориентационным переходом коллагена в монослой. Из табл. 1 видно, что процесс переориентации молекул коллагена в монослой при сжатии происходит при всех изученных значениях рН, причем их положение и параметры зависят от величины рН. Переориентация молекул коллагена в разных областях двумерного давления отражается и на петлях гистерезиса двумерного давления сжатия и растяжения (рис. 4, а и б). Видно, что в области жидкорастянутого состояния имеется небольшой гистерезис до плато (рис. 4, а), в области жидкоконденсированного состояния гистерезис проявляется сильнее после плато (рис. 4, б). Причиной гистерезиса могут быть межмолекулярные взаимодействия молекул коллагена, которые приводят к сетчатой двумерной структуре на поверхности подложки, которая при растяжении разрывается и оставляет обрывки скрепленных коллагеновых поверхностных структур. Поверхностное давление падает при этом тем ниже, чем больше поверхностная кон-

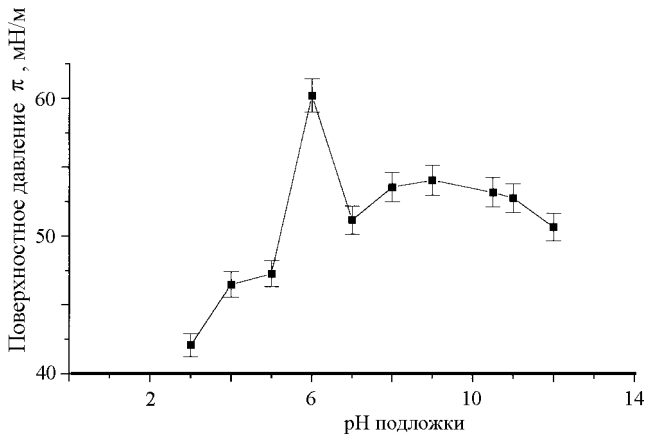


Рис. 3. Зависимость давления коллапса π_{\max} коллагена на границе вода – воздух от рН подложки. Концентрация наносимого коллагенового раствора $C = 8.6 \cdot 10^{-6}$ М

центрация коллагена, полученная при сжатии пленки. Это свидетельствует об образовании прочно связанных надмолекулярных структур и является весомым аргументом в пользу предположения о фибриллообразовании в монослое коллагена. В растворе коллагена (и в живом организме) образование коллагенового волокна происходит в результате спонтанного, специфического соединения между собой трехцепочечных спиральных коллагеновых молекул. Основу структурной организации коллагеновых фибрилл составляют сдвинутые на $1/4$ ступенчато расположенные параллельные ряды коллагеновых молекул. Особенность фибрилл коллагена состоит в том, что расположенные в ряд молекулы не связаны «конец в конец», между концом одной молекулы и началом следующей имеется промежуток около 40 нм. Известно, что фибриллообразование в монослое характерно для других фибриллообразующих белков – миозина и тубулина. По коллагену такие исследования не проводили, однако склонность к образованию фибрилл в растворе у коллагена выше, чем у этих белков.

Образование связанных двумерных структур коллагена на поверхности воды подтверждается расчетами модулей упругости в областях жидкорастянутого (до плато) и жидкоконденсированного (после плато) состояния. В табл. 2 приведены рассчитанные модули эластичности ϵ_0 ($\epsilon_0 = d\pi/d\ln A$) и соотношения $d\pi/d\Gamma$, показывающие вклад поверхностной концентрации в изменение двумерного давления для всех изученных изотерм при разных рН подложки. При всех значениях рН в областях жидкорастянутого и жидкоконденсированного состояния найдены довольно большие значения модулей эластичности (от 12 до 40 мН/м), при этом при больших поверхностных концентрациях (после плато на изотермах двумерного давления) примерно в 2.5 раза выше, что свидетельствует о большем числе контактов между молекулами и фибриллами коллагена. Модуль эластичности в области после

плато наибольший в изоэлектрическом состоянии (рН 6.0) и составляет 67 мН/м.

В области жидкорастянутого состояния значение $d\pi/d\Gamma$ изменялось от 20 до 60, в области жидкоконденсированного – от 10 до 35. Это означает, что при больших поверхностных концентрациях двумерное давление изменяется меньше вследствие специфической ориентации молекул. Такая ориентация дает возможность образования большего числа фибрилл и межмолекулярных необратимо-разрушающихся контактов, обуславливающих модуль эластичности двумерной самоорганизующейся структуры коллагена на жидкой подложке.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 98-03-33365а.

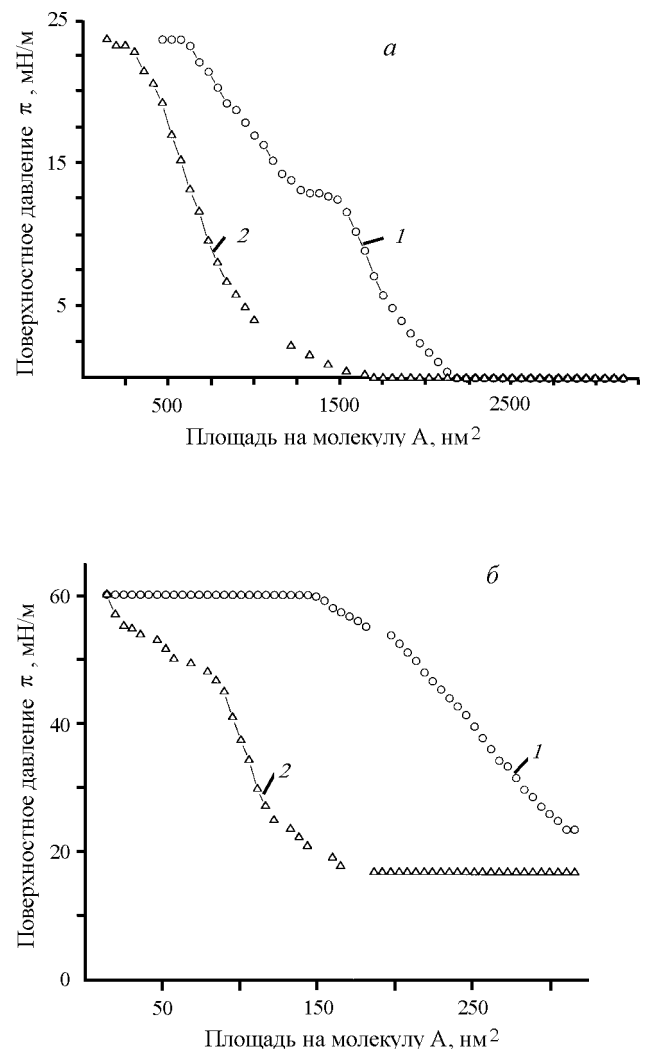


Рис. 4. Изотермы двумерного давления ($\pi - A$): 1 – сжатия, 2 – растяжения монослоев коллагена на границе вода – воздух при рН 6.0 и разных степенях сжатия монослоя. Растяжение из области : а – плато, б – коллапса. Концентрации наносимого коллагенового раствора $C = 8.6 \cdot 10^{-6}$ и $8.6 \cdot 10^{-7}$ М

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д. Поверхностные явления в белковых системах. М., 1988.
2. Ямпольская Г.П., Измайлова В.Н., Разникова Г.П., Нусс П.В. // Изв. Академии наук. Сер. физ. 1995. **59**. P. 109.
3. Слуцкий Л.И., Симхович Б.З. // Успехи современной биологии. 1980. **89**. С. 58.
4. Lee Robert E., Davison Peter F. // Experimental eye research. 1981. **32**. P. 737.
5. Ellis S.C., Pankhurst K.G.A. // Nature. 1949. **163**. P. 600.
6. Ellis S. C., Pankhurst K. G. A. // Transactions of the Faraday Society. 1954. **50**. P. 82.
7. Clark S.G., Holt P.F. // Transactions of the Faraday Society. 1957. **53**. P. 1509.
8. Ellis S.C., Pankhurst K.G.A. Interaction of tanning materials with collagen monolayers. // Discussions of the Faraday Society. 1954. **16**. P. 170.
9. Nakamura Makoto, Kawato Kazuko, Matuura Ryohei // Memoirs of the Faculty of Science. Kyushu University. Ser. C. Chemistry. 1978. **C10**. P. 183.
10. Polatnick Jerome, La Tessa A. J., Katzin H. M. // Biochim. biophys. acta. 1957. **26**. P. 365.
11. Keeley F.W., Morin J.D., Vessely S. // Experimental eye research. 1984. **39**. P. 533.
12. Birk David E., Silver Frederick H. // Internat. J. Biolog. Macromolec. 1983. **5**. P. 209.
13. Borcharding Maxine S., Blacik L.J., Sittig R.A., Bizzell James W., Breen M., Weinstein H.G. // Experimental eye research. 1975. **21**. P. 59.
14. Quantock Andrew J., Meek Keith M. // Biophysical Journal. 1988. **54**. P. 159.
15. Young Robert D. // Journal of Cell Science. 1985. **74**. P. 95.
16. Демин Ю.А., Шарлей Т.М. // Криобиология. 1988. С. 43.
17. Демин Ю.А., Юрченко Т.Н., Шарлей Т.М. Влияние охлаждения на биологические объекты. Харьков, 1990. С. 38.
18. Слуцкий Л.И., Шелекетина И.И. // Вопросы медицинской химии. 1959. **5**. С. 466.
19. Авдеев В. Г. // Вопросы медицинской химии. 1977. **23**. С. 562.

Поступила в редакцию 02.04.98